

SELEÇÃO DE GENITORES DE UVAS DE MESA COM BASE EM CARACTERES MOLECULARES DO TIPO RAPD E MICROSATÉLITES

Patrícia Coelho de Souza Leão¹, Cosme Damião Cruz² e Sérgio Y. Motoike³

Resumo

Quarenta e sete cultivares de uvas de mesa procedentes do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semi-Árido foram analisados com 20 primers polimórficos RAPD e sete marcadores moleculares microsátélites. Distâncias genéticas entre pares de acessos foram obtidas com base no índice de similaridade de Jaccard para dados de RAPD e complemento aritmético do índice ponderado para dados de microsátélites. Os grupos foram separados de acordo com método de Tocher e UPGMA. Os marcadores microsátélites foram mais eficientes que RAPD na identificação das relações de parentesco. As informações de distância genética baseada em características morfo-agronômicas e moleculares aliada ao desempenho agrônomo das cultivares permitiram a recomendação de cruzamentos, visando à obtenção de híbridos superiores nas populações segregantes do programa de melhoramento de videira da Embrapa Semi-Árido.

Introdução

O estudo da diversidade genética é de fundamental importância em um programa de melhoramento genético, pois, permite, entre outros aspectos, identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico, que resultam em maior probabilidade de recuperação de genótipos superiores na descendência. A viabilidade da utilização da divergência genética como critério de seleção de genitores para cruzamentos tem sido demonstrada em diversas espécies, entre elas, a videira. Os estudos de diversidade genética e identificação de cultivares em videira são baseados em estudos clássicos de ampelografia (palavra grega que significa *ampelos* – videira e *graphos* – descrição) que consiste na análise e comparação de características morfológicas de folhas, tipo de brotos, cachos e tipo de baga (IPGRI UPOV OIV, 1997; GALET, 1998). No entanto, este método apresenta inúmeras dificuldades e desvantagens. Para superar estas limitações, marcadores moleculares baseados em DNA têm sido utilizados em tais estudos. Este trabalho teve como objetivo principal, estudar a diversidade genética existente em um conjunto de quarenta e sete acessos de uvas de mesa que fazem parte do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semi-Árido, utilizando marcadores moleculares RAPD e microsátélites.

Material e Métodos

DNA genômico foi extraído de folhas jovens da porção apical dos brotos de quarenta e sete cultivares de uvas de mesa oriundas do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semi-Árido, em Juazeiro, Bahia, utilizando-se o protocolo CTAB proposto por Lodhi et al. (1994) com algumas modificações. Para as reações de RAPD foi utilizado um volume final de 12,5 µl de reação composta de aproximadamente 10 ng/µl de DNA; 1,25 µl de tampão 10X (Invitrogen); MgCl₂ 25 mM (Invitrogen); 2,5 mM de cada um dos desoxinucleotídeos; *primer* 4 µM; BSA (*bovine serum albumine*) 10mg/ml e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Sete marcadores microsátélites: VVS2 (THOMAS e SCOTT, 1993), VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31 (BOWERS et al. 1996; BOWERS et al. 1999), VrZAG79 e VrZAG62 (SEFC et al. 1999) foram amplificados em uma reação de volume final de 10 µL consistindo de 2,5 ng/µL de DNA; 10 pmoles de cada *primer*; 2,5 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (Applied Biosystem); 1 µL de tampão Gold 10X (Applied Biosystem); MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystem) e 0,5U de *AmpliTaq* Gold DNA polimerase. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) cujo programa de ciclagem foi padronizado para todos os *primers* RAPD e apresentou as seguintes etapas: dois ciclos de 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 35°C e 1 minuto à 72°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos à 94°C, 30 segundos à 35°C e 1 minuto à 72°C, e uma etapa final de extensão de 7 minutos à 72°C. As reações de PCR para todos os *primers* microsátélites consistiram nas seguintes etapas: 5 minutos à 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos à 95°C, 45 segundos à 60°C, 1 minuto à 72°C e uma etapa de extensão final de 7 minutos à 72°C. As distâncias entre os pares de indivíduos foram estimadas pelo complemento aritmético do índice ponderado. As análises estatísticas foram realizadas no software Genes <http://www.ufv.br/dbg/genes/GenesEUA.htm> (CRUZ, 2008). A matriz de dissimilaridade obtida foi utilizada na obtenção do agrupamento dos acessos pelos métodos de otimização de Tocher, e método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridade (UPGMA).

Resultados e Discussão

Os vinte *primers* RAPD utilizados apresentaram elevado polimorfismo, produzindo um total de 111 marcas polimórficas, nítidas e estáveis, que corresponderam a 81,6% do total de bandas amplificadas. O polimorfismo encontrado foi superior àquele observado em trabalhos prévios com videira (BORREGO et al., 2002; ULANOVSKY et al., 2002; LUO e HE, 2001). Os *primers* microsátélites amplificaram um total de 75 alelos, variando de 9 no loco VVMD5 até 13, no loco VVS2, obtendo-se uma média de 10,7 alelos por loco. Observou-se a presença de 48,7% de alelos raros, com frequência inferior a 5%. Os alelos mais frequentes por loco foram VVMD5-236 (27,3%), VVMD7-239 (29%), VVMD27-194 (26,6%), VVMD31-212 (42,3%),

¹ Pesquisadora da Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 152, Zona Rural 56300-970 - Petrolina, PE - Brasil - Caixa-Postal: 23, Fone: (87) 38621711 Fax: (87) 38621744. patricia@cpatsa.embrapa.br

² Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, BIOAGRO. - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL CENTRO 36570000 - Viçosa, MG. cdacruz@ufv.br

³ Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia. Setor de Fruticultura Campus Universitário 36571000 - Viçosa, MG. motoike@ufv.br

VVS2-135 (22,6%), VrZAG79-255 (24,4%) e VrZAG62-189 (38,3%). A heterozigosidade variou de 74,7% no loco VVMD31 a 84,7% no loco VrZAG79, o qual apresentou também o maior valor para conteúdo de informação polimórfica-PIC (83,0%). Os valores de distância genética com base no complemento aritmético do índice de Jaccard variaram de 0,25 entre os clones intravarietais 'Itália melhorada' e 'Brasil', que se destacaram como os acessos mais relacionados geneticamente, e 0,68 entre o par de acessos 'Piratiniga' e 'Niágara Rosada', que foram os mais divergentes. Por sua vez, para os dados moleculares de microsatélites, obteve-se uma variação de medidas de distâncias de 0 a 1, onde 0 representou a coincidência de todos os alelos, ou seja, o par de acessos correspondem a um genótipo único e 1, significando que o par de acessos considerado não compartilhou nenhum alelo, e portanto, apresentaram distância genética máxima. As bandas polimórficas RAPD permitiram diferenciar todos os acessos estudados. Por outro lado, os resultados com base em 7 marcadores moleculares microsatélites demonstraram a coincidência dos perfis alélicos em três pares de acessos, 'Thompson Seedless' e 'Canner', 'A1581' e 'A1105' e 'Centennial Seedless' e 'Dawn Seedless', evidenciando que um maior número de marcadores microsatélites é necessário para discriminar os genótipos. Os resultados obtidos pela análise de agrupamento foram diferentes considerando-se os dois tipos de marcadores moleculares utilizados, o que está de acordo com Merdinoglu et al. (2000) que mencionam que embora os marcadores RAPD, SSR e AFLP tenham sido capazes de diferenciar sete grupos de cultivares de videira, a topologia dos dendogramas obtidos foi única, e os marcadores SSR refletiram melhor as relações genéticas entre os grupos e sua origem geográfica. As matrizes de dissimilaridade obtidas a partir dos dados binários de RAPD e da frequência alélica dos locos de microsatélites foram distintas, portanto, não houve concordância para os acessos mais e menos divergentes entre os dois tipos de marcadores utilizados. Considerando-se que as relações de parentesco entre os acessos foram mais bem visualizadas por meio dos marcadores microsatélites, as distâncias genéticas calculadas a partir dos dados microsatélites foram utilizadas para estabelecer cinco acessos mais divergentes em relação a dez cultivares (Tabela1). O conhecimento dos acessos mais divergentes é fundamental para orientar o melhorista na escolha das melhores combinações híbridas. Entretanto, na escolha dos genitores, deve-se considerar, além da divergência genética, as características agronômicas dos genótipos, bem como, os objetivos do programa de melhoramento. Estudos de divergência genética baseados em características morfo-agronômicas foram realizados nesta coleção por Leão, (2008) e Borges et al., (2008).

Conclusões

Os marcadores moleculares RAPD foram suficientes para diferenciar todos os acessos de uvas de mesa estudados, entretanto, microsatélites foram capazes de discriminar 44 acessos de uvas de mesa do BAG da Embrapa Semi-Árido. A análise dos perfis moleculares de microsatélites demonstrou a coincidência dos perfis alélicos em três pares de acessos. Os métodos de otimização de Tocher e hierárquico UPGMA apresentaram grande concordância na formação dos grupos, entretanto, quando se utilizou UPGMA observou-se uma maior coerência entre a formação dos grupos e a genealogia dos cultivares. Não houve concordância entre as matrizes de dissimilaridade, formação dos grupos pelo método de Tocher e topologia dos dendogramas obtidos pelo método UPGMA, quando foram utilizados dados moleculares RAPD e microsatélites. Os marcadores moleculares microsatélites foram mais eficientes para o estudo das relações de parentesco e uma vez que é possível se obter os alelos em pares de bases, ele permite a comparação de resultados entre diferentes bases de dados, sendo o marcador mais recomendado para estudos de caracterização e diversidade de germoplasma de videira. Os métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA, independente do tipo de marcadores utilizados, foram eficientes na separação dos acessos com base em sua genealogia e espécie botânica, evidenciando-se relações de parentesco entre os acessos de um mesmo grupo. A análise de diversidade baseada em dados moleculares microsatélites aliada às características agronômicas permitiu a recomendação de diversos cruzamentos, destacando-se aqueles entre cultivares de uvas sem sementes.

Referências

- BORGES R.M.E.; GONÇALVES N.P.S.; GOMES A.P.O., ALVES E.O.S. Divergência fenotípica entre acessos de uvas de mesa no semi-árido brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, n. 43, p.1025-1030, 2008.
- BOWERS, J.; DANGL, J. S.; MEREDITH, C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50:3: 243-246, 1999.
- BORREGO, J.; ANDRÉS, M. T. de; GÓMEZ, J. L.; IBÁÑEZ, J. Genetic study of Malvasia and Torrontes groups through molecular markers. *American Journal Enology and Viticulture*, Davis, v. 53, n. 2, p. 125-130, 2002.
- BOWERS, J.; DANGL, J. S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C. P. DANGL, J. S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C. P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39: 628-633, 1996.
- CRUZ, C.D. *Programa Genes - Diversidade Genética*. Editora Viçosa, Viçosa, 2008.
- GALET, P. *Grape varieties and rootstocks varieties*. Franca: Oenoplurimédia sarl, 1998, 315p.
- IPGRI, UPOV, OIV. *Descriptors for Grapevine (Vitis spp.)*. International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva, Switzerland/Office International de la Vigne et du Vin, Paris, France/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1997.
- KARP, A. *The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity?* In: ENGELS, J. M. M.; RAMANATHA RAO, V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. (Eds.) *Managing Plant Genetic Diversity*, Proceedings of the International Conference on Science and Technology for Managing Plant Genetic Diversity in the 21st Century, Kuala Lumpur. Malasia, 12-16 junho 2000. CAB Internacional:IPGRI, Walingford, 2001.
- LEÃO, P. C. de S. *Recursos genéticos de videira (Vitis spp.): análise da diversidade e caracterização da coleção de germoplasma da Embrapa Semi-Árido*. Tese doutorado: Universidade Federal de Viçosa, 114p. 2008.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

LUO, S.; HE, P. Discrimination of wild grapes native to China by RAPD markers. *Vitis*, 40:3:163-168, 2001.

MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BAUR, C.; BALTHAZARD, J. Comparison of RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for genetic diversity analysis in *Vitis vinifera* L. *Acta Hort.* 528:193-195, 2000.

SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42: 367-373, 1999.

THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetic*, 86: 985-990, 1993.

ULANOVSKY, S.; GOGORCENA, Y.; MARTÍNEZ DE TODA, F.; ORTIZ, J. M. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 92:241-254, 2002.

| Cultivares | Acessos mais divergentes |
|-------------------------|--|
| A Dona | Kyoho, Vênus, Princess, Seyve Villard 20365, Feal |
| BRS Clara | Kyoho, Niágara Rosada, Vênus, Patrícia, Seyve Villard 12375 |
| BRS Linda | Niágara Rosada, Seyve Villard 12375, Isabel Precoce, Kyoho, Feal |
| BRS Morena | Kyoho, Niagara Rosada, Patrícia, Seyve Villard 12375, Canner |
| Centennial Sds | Kyoho, Niagara Rosada, Patrícia, Seyve Villard 12375, Isabel Precoce |
| Crimson Seedless | Niágara Rosada, Seyve Villard 12375, Vênus, Kyoho, Isabel Precoce |
| Marroo Seedless | Seyve Villard 12375, Isabel Precoce, Vênus, Niágara Rosada, Ferlongo |
| Perlette | Kyoho, Isabel Precoce, Princess, Niágara Rosada, Vênus |
| Princess | Vênus, Niágara Rosada, Beni Fugi, Perlette, Piratininga |
| Thompson Sds | Isabel Precoce, Dattier de Beiroth, Niágara Rosada, Patrícia, Vênus |

| N | Acessos | N | Acessos | N | Acessos |
|----|------------------------|----|----------------------|----|---------------------|
| 1 | Branca Salitre | 18 | Vênus | 35 | Ferlongo |
| 2 | Dattier de Beiroth | 19 | Fiesta | 36 | Benitaka |
| 3 | Beni Fugi | 20 | July Muscat | 37 | Christmas Rose |
| 4 | Beauty Seedless | 21 | Kyoho | 38 | A Dona |
| 5 | Seyve Villard 20365 | 22 | A 1105 | 39 | Moscatel Nazareno |
| 6 | Marroo Seedless | 23 | A 1118 | 40 | BRS Morena |
| 7 | BRS Linda | 24 | Patrícia | 41 | BRS Clara |
| 8 | Red Globe | 25 | Estevão Marinho | 42 | Juliana |
| 9 | Moscatel de Alexandria | 26 | Itália melhorada | 43 | Seyve Villard 12375 |
| 10 | Cardinal | 27 | Blush Seedless | 44 | Lakemont Seedless |
| 11 | Feal | 28 | Piratininga | 45 | Dona maria |
| 12 | A 1581 | 29 | Brasil | 46 | Niagara Rosada |
| 13 | Centennial Seedless | 30 | Crimson Seedless | 47 | Isabel Precoce |
| 14 | Perlette | 31 | Dawn Seedless | | |
| 15 | Canner | 32 | Thompson Seedless | | |
| 16 | Ruby Seedless | 33 | Princess | | |
| 17 | Flame Seedless | 34 | Moscatel de Hamburgo | | |

[illegible]

